

FACULTE DE MEDECINE BROUSSAIS
HOTEL DIEU
UNIVERSITE PARIS VI

ANNEE 1971

N°

T H E S E

pour le

DOCTORAT en MEDECINE

(Doctorat d'Etat)

par

Monique S C H M I T T

née le 1er novembre 1945 à BUCAREST (Roumanie)

Présentée et soutenue publiquement le

VALEUR ANTIGENIQUE DU LEPROME MURIN
DANS L'ETUDE IMMUNOLOGIQUE
DE LA LEPRE HUMAINE

Président Monsieur Félix-Pierre MERKLEN, Professeur

On the 1st of July 1864
I received from you a letter
of the 27th inst. in relation
to the matter of the
1st of July 1864

I have the honor to
acknowledge the receipt of
your letter of the 27th inst.

I have the honor to
acknowledge the receipt of
your letter of the 27th inst.

I have the honor to
acknowledge the receipt of
your letter of the 27th inst.

I have the honor to
acknowledge the receipt of
your letter of the 27th inst.

I have the honor to
acknowledge the receipt of
your letter of the 27th inst.

I have the honor to
acknowledge the receipt of
your letter of the 27th inst.

I have the honor to
acknowledge the receipt of
your letter of the 27th inst.

I have the honor to
acknowledge the receipt of
your letter of the 27th inst.

FACULTE DE MEDECINE BROUSSAIS
HOTEL DIEU
UNIVERSITE PARIS VI

ANNEE 1971

N°

T H E S E

pour le

DOCTORAT en MEDECINE

(Doctorat d'Etat)

par

Monique S C H M I T T

née le 1er novembre 1945 à BUCAREST (Roumanie)

Présentée et soutenue publiquement le

VALEUR ANTIGENIQUE DU LEPROME MURIN
DANS L'ETUDE IMMUNOLOGIQUE
DE LA LEPRE HUMAINE

Président Monsieur Félix-Pierre MERKLEN, Professeur



A mes Parents

à qui je dois tout

A mon frère, à ma grand - mère avec toute
ma tendresse

A ma famille

A mademoiselle Freyssines (Mamie)
sans qui rien n'eut été possible
en hommage posthume.

A mon Maître

Monsieur le Professeur Félix-Pierre MERKLEN
Professeur de Pathologie Expérimentale
à la Faculté de Médecine de Paris

Membre de l'Académie Nationale de Médecine

Médecin de l'Hôpital Saint Louis

qui m'a proposé le sujet, m'a guidé dans l'élaboration
et la réalisation de cette thèse, et en a accepté la
présidence.

Avec toute ma gratitude.

A mes Maitres

Monsieur le Professeur Ag. COTTENOT

qui a bien voulu me guider et me conseiller
dans ce travail

En témoignage de ma reconnaissance

A Monsieur le Docteur FOUCHARD

En le remerciant pour toute sa gentillesse

A Monsieur le Docteur A. CLAUDE

pour les conseils et l'enseignement patient
qu'il m'a pratiqués

A Monsieur le Docteur Jean- Claude POTIER
pour l'° aide efficace qu'il m'a apportée

A Mademoiselle DUMONT
A Mademoiselle CHAVIN COLIN
A tout le personnel du Laboratoire de
Pathologie Expérimentale

Avec tous mes remerciements

INTRODUCTION - GENERALITES

Les MYCOBACTERIES comprennent entre autres bacilles acido-alcoolo-résistants, le bacille de Hansen et le bacille de Stefanski, respectivement responsables de la lèpre de l'homme et de la lèpre du rat.

*

* *

Le bacille de Hansen, ou Mycobacterium leprae est l'agent de la lèpre humaine avec son affinité particulière pour le revêtement cutané-muqueux, muqueuse nasale incluse, et pour les nerfs périphériques, spécialement troncs du cubital et du sciatique poplité externe et filets du plexus cervical superficiel.

Ce n'est que dans les formes lépromateuses, caractérisées du point de vue histologique par la cellule spumeuse de Virchow et du point de vue cutané par des lésions fortement infiltrées, nodulaires ou diffuses et mal limitées, que peut être retrouvé le bacille acido-alcoolo-résistant, tandis qu'il ne l'est pratiquement pas dans les formes tuberculoïdes : non bacillifères et par suite non ou peu susceptibles de contagiosité, elles sont caractérisées histologiquement par leurs infiltrats épithélioïdes essaimant jusque dans le derme profond, autour des annexes ou en amas à contours plus ou moins polygonaux ou géographiques, et cliniquement par des lésions cutanées généralement peu infiltrées, mais surtout nettement délimitées avec un bord nettement tranché vers la peau saine environnante.

Les lèpres lépromateuses sont graves par la dissémination bacillaire à laquelle l'organisme semble opposer peu de résistance : elles peuvent causer des atteintes ganglionnaires, nerveuses (bilatérales et centrifuges), osseuses et ostéo-articulaires, oculaires,

viscérales, abdominales, testiculaires.

Les lèpres tuberculoides correspondent à une meilleure résistance tissulaire, dont témoigne la positivité ultra-tardive, vers la troisième ou quatrième semaine, de l'intra-dermo réaction à la lépromine, qui reproduit ici la réaction tissulaire épithélioïde (s'opposant à sa négativité dans les formes lépromateuses). Mais cette apparente meilleure résistance n'empêche pas l'affinité de la maladie pour les nerfs périphériques de se manifester, et l'absence de bénignité de cette forme se traduit trop souvent par des atteintes nerveuses qui entraînent des anesthésies étendues, des amyotrophies et des paralysies (aboutissant électivement aux griffes cubitales ou médio-cubitales ou au steppage), des lésions trophiques distales cutanées ou osseuses, des lésions oculaires secondaires à l'atteinte motrice du facial ou sensitive du trijumeau.

Entre ces deux types extrêmes de lèpre, dits types polaires, qui sont les deux aboutissants habituels de la maladie, prennent place des formes dites interpolaires où le bacille de Hansen peut être absent ou difficilement révélé : formes borderline ou dimorphes formes indifférenciées (initialement ou de façon plus ou moins durable).

Résulte de ce rapide exposé que de nombreux cas de lèpre humaine peuvent être considérés comme non -contagieux, ce qui, avec la relativement faible contagiosité des formes bacillifères, a contribué à faire rejeter par les milieux avertis, la renommée autrefois si terrifiante de la lèpre humaine, quelque intérêt que puisse y trouver une certaine littérature.

Ainsi existent de nombreux cas de lèpre où le diagnostic ne peut reposer sur la mise en évidence du bacille de Hansen ; n'est d'aucune valeur diagnostique l'intradermo- réaction à la lépromine, négative dans

les formes les plus nettement évolutives, souvent positive parallèlement aux tuberculino-réactions en dehors de toute infection hansénienne, parfois positivée en milieu d'endémie sans lèpre évolutive (comme se positive en milieu tuberculisé les réactions tuberculiniques) : la réaction de Mitsuda n'a ainsi qu'une valeur de classification dans les cas de lèpre humaine avérée.

Aussi pouvait être d'intérêt diagnostique capital dans certains cas en clinique la mise en évidence d'anticorps sériques anti-hanséniens par les techniques modernes d'immunofluorescence.

Mais ces espoirs se heurtaient à l'impossibilité de pouvoir disposer à volonté de quantités suffisantes de bacille de Hansen. En effet, cette mycobactérie ne semble pas avoir jusqu'à présent pu être obtenue en culture de façon sûre : le bacille acido-résistant obtenu, et parfois repiquable en série, s'est très généralement vérifié non -hansénien et les quelques succès signalés semblent bien avoir en fait concerné essentiellement des mycobactéries recueillies chez des lépreux qui après un certain emballement initial, se sont avérées totalement différentes de *mycobacterium leprae*.

La transmission expérimentale de la maladie humaine à l'animal, même au singe, n'a pas été jusqu'ici suivie de succès, en dehors de la très artificielle multiplication de bacilles obtenus par inoculation au coussinet plantaire ou à l'oreille de la souris, avec cependant quelques disséminations observées chez des souris fortement irradiées et thyroïdectomisées. En dehors de cette inoculation très particulière, la maladie s'est avérée exclusivement spécifique de l'espèce humaine.

Ainsi il s'avère impossible d'obtenir par culture ou par inoculation la multiplication d'un bacille de Hansen utilisable dans

dans des recherches de laboratoire.

*

* *

Le bacille de Stefanski ou mycobacterium leprae murium est l'agent d'une maladie du rat, cause de lésions cutanées (indurations, alopecies et éventuellement ulcérations) et de lésions ganglionnaires lymphatiques.

Le bacille de la lèpre du rat a beaucoup d'analogies avec le bacille de la lèpre humaine : non seulement les lésions qu'il provoque chez le rat ont fait parler de " lèpre murine ", non seulement il est morphologiquement très voisin du bacille de Hansen au point qu'il n'en est pratiquement pas discernable, mais il n'est lui aussi ni cultivable, ni inoculable en dehors de son espèce d'origine, mises à part les inoculations locales possibles réalisées à la patte de la souris, de petits rongeurs ou du lapin au Laboratoire du Pavillon de Malte.

Il était tentant de voir si des analogies ne se doublent pas d'analogies antigéniques permettant de substituer aux extraits de lépromes humains et aux bacilles de Hansen des extraits de lépromes murins et des bacilles de Stefanski dans des études immunologiques sur la lèpre humaine.

I- MISE EN EVIDENCE PAR IMMUNOFLUORESCENCE d'ANTICORPS SERIQUES DANS LA LEPRE HUMAINE

Un anticorps conjugué à une substance fluorescente garde ses propriétés immunologiques et son existence est dépistée par sa fixation sur l'antigène figuré correspondant que cette fixation rend fluorescent au microscope en lumière ultraviolette.

L'immunofluorescence directe rend visible l'antigène figuré sur lequel se sont fixés les anticorps de l'immunsérum correspondant préalablement conjugués à de l'isothiocyanate de fluorescéine.

L'immunofluorescence indirecte utilise les anticorps antiglobuline humaine développés dans l'immunsérum d'un lapin et rendus fluorescents pour dépister les globulines anticorps développées dans un sérum humain et fixées dans un premier temps sur l'antigène figuré correspondant. Cette technique indirecte est la plus couramment utilisée car l'immunsérum antiglobulines humaines est seul à conjuguer à la solution fluorescente sans nécessiter pour chacun des sérums étudiés la conjugaison préalable de ses globulines à une substance fluorescente.

A- IMMUNOFLUORESCENCE SUR BACILLE DE HANSEN

La mise en évidence par MORRIS et ses coll. puis par MERKLIEN, COTTENOT et GALISTIN d'un Anticorps anti-hansénien dans les sérums de lèpre humaine a été possible par utilisation de bacilles de Hansen provenant pour les premiers de foie lépromateux, pour les seconds de frottis de mucus nasal d'une forme lépromateuse fixés 10 minutes dans l'acétone puis placés 30 minutes en contact avec le sérum à étudier : les bacilles peuvent devenir visibles au microscope de fluorescence en fixant un anticorps présent dans un sérum préalablement conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine (technique directe)

Un contact préalable de 30 minutes avec un sérum non conjugué, suivi d'un lavage à l'eau physiologique tamponnée, permet de découvrir la fixation d'un anticorps anti-hansénien par la fluorescence bacillaire secondairement obtenue en recouvrant pendant 30 minutes le frottis d'une goutte d'immunsérum de lapin renfermant l'antiglobuline humaine rendue préalablement fluorescente (technique indirecte). Au contraire, avec des sérums humains normaux, les bacilles restent non fluorescents, et par suite invisibles en microscopie de fluorescence, aussi bien en technique indirecte qu'en technique directe.

Ces constatations ont pu être faites avec tous les sérums de lèpre non traitée ou encore en activité, quelle que soit la forme de la maladie de Hansen d'où ils provenaient, aussi bien dans les formes tuberculoïdes que dans les formes lépromateuses.

MM. MORIS, AULISIO, ROZEMAN et GUINTO avaient également démontré en 1961 la parenté antigénique avec le bacille de Koch dont le sérum de lépreux est capable de rendre la visibilité en immunofluorescence tandis que des sérums de tuberculeux sont capables de rendre visible le bacille de Hansen aussi bien que le bacille tuberculeux. Cependant cette fixation croisée est supprimée par l'absorption préalable des sérums tuberculeux sur des bacilles tuberculeux ou des sérums lèpreux sur des bacilles lèpreux.

Or si cette technique représente un grand progrès sur les autres techniques précitées, elle présente cependant un désavantage non négligeable du fait de la quasi impossibilité de cultiver le bacille de Hansen et de l'inoculer en dehors de l'espèce humaine. De plus, il ne peut être retrouvé dans de nombreux prélèvements faits dans les diverses formes de lèpre humaine. Il n'est possible d'en disposer que sur des frottis faits à partir des formes lépromateuses, et encore, avant que le traitement en ait fortement réduit le nombre et modifié

la morphologie.

Aussi dans les laboratoires de recherche léprologique, on utilise de plus en plus couramment le bacille de la lèpre murine, malgré les caractères légèrement différents des lésions qu'il provoque, mais surtout à cause des multiples analogies: morphologiques, tinctoriales, impossibilité de culture sur milieu et actuellement l'inoculation en série du bacille de Stefanski de rat à rat par inoculation de broyats de tumeurs lépromateuses prélevées sur des rats blancs inoculés avec une souche de bacilles entretenue depuis plusieurs années au Laboratoire du Pavillon de Malte. Ces broyats ont été effectués tantôt en sérum chloruré sodique à 8 %, tantôt en liquide Hanks mais sans sérum de veau et sans antibiotique.

B - IMMUNOFLUORESCENCE SUR BACILLE DE STEFANSKI

Le bacille murin s'est révélé capable de fixer l'anticorps antibacillaire des sérums anti-hanséniens humains et de devenir fluorescent, soit directement, soit indirectement, avec l'anticorps anti-hansénien ou avec l'anticorps antiglobuline humaine préalablement rendue fluorescente, alors que le contact avec le sérum humain normal ne donne aucune fluorescence.

N.B. La fluorescence sur bacille de Hansen est inhibée par l'absorption préalable du sérum de lépreux sur bacille de Stefanski, cette fixation des anticorps circulants humains par le bacille murin confirmant l'existence de réactions immunologiques croisées et de parenté antigénique étroite entre bacilles lépreux humains et murins.

Parallèlement on a remarqué que dans le sérum des seules tuberculoses évolutives donc riches en anticorps sériques, on a découvert un anticorps antibacillaire dont la fixation sur le bacille de Hansen est identiquement décelable par immunofluorescence à celle sur le bacille de Stefanski.

L'absorption préalable du sérum tuberculeux par une culture de bacilles de Calmette et Guérin empêche l'immunofluorescence de se produire et fait donc disparaître par fixation antérieure sur ces bacilles l'anticorps susceptible de se fixer sur les bacilles lépreux.

On préfère cependant utiliser en laboratoire les bacilles de Stefanski de préférence au bacille Calmette et Guérin.

On a ainsi pu substituer au bacille de Hansen, de manipulation dangereuse le bacille de Stefanski, d'obtention et de maniement plus facile, puisque non pathogène pour l'homme ; entretenue par passages répétés, sa constance antigénique est plus vraisemblable que celle d'un bacille hansénien plus ou moins difficilement recueilli dans les lésions humaines d'ancienneté, d'activité et de richesse variables.

II - APPLICATION DIAGNOSTIQUE: SERODIAGNOSTIC PAR IMMUNOFLUORESCENCE sur BACILLE DE STEFANSKI

Actuellement le sérodiagnostic par immunofluorescence sur bacille de Stefanski permet de diriger l'existence et d'apprécier quantitativement les anticorps circulants qui se fixent sur les bacilles de la lèpre murine.

TECHNIQUE

1) Matériel antigénique

a) Il est constitué par des frottis de lépromes murins riches en bacilles de Stefanski. Ces tumeurs sont obtenues par inoculation sous-cutanée, axillaire et unguinale au rat de fragments de lépromes broyés et en suspension dans du sérum physiologique.

Après inoculation, le léprome se développe pendant 2 à 4 mois atteignant le volume d'une noisette, parfois plus volumineux. Les animaux seront examinés chaque semaine à ce stade et sacrifiés avant l'apparition d'ulcération ou de nécrose cutanée.

Il est possible, en attente d'une nouvelle inoculation, de conserver un léprome mûr en tube bouché, étanche à -20° , pendant une période de 6 semaines à 1 mois, mais le résultat de l'inoculation ultérieure est susceptible de se faire attendre 1 à 2 mois de plus.

b) Les frottis seront faits par écrasement d'un petit fragment de léprome sur une lame de microscope parfaitement propre ; il y a intérêt à utiliser la partie centrale des lépromes et non le cortex riche en tissu adipeux et parfois générateur d'autofluorescence gênante. Il est commode de faire des frottis de petite dimension : 1 cm de diamètre environ. Puis de les fixer 10' par immersion dans l'acétone anhydre et de les conserver séchés pendant 8 à 10 jours en boîte de Pétri à -20° .

2) Immunsérum antiglobuline humaine

Il est obtenu par injections au lapin à doses croissantes et convenablement espacées de gammaglobulines humaines.

a) On part d'une solution de gammaglobulines transfusionnelles à 16,5 % obtenues par centrifugation à 0° , pendant 20' à 2.500 tours/minutes ou de 10' à 3.000 tours / minute et après rejet du surnageant.

1 cc de cette solution est dilué dans 10 cc de tampon phosphate pH 7,2 (PO_4HNa_2 sec : 6,81 g - $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$: 2,54 g - H_2O bidistillée, O.S.P. : 1000 cc).

On ajoute à cette solution de gammaglobulines un volume égal d'une solution aqueuse d'alun de potassium à 2 %. Le pH sera contrôlé par addition de quelques gouttes d'une solution alcoolique de bleu de bromothymol et la couleur verte maintenue par addition de lessive de soude au 1/5ème.

b) Immunisation des animaux

Les lapins reçoivent pendant 4 semaines, 4 injections chaque semaine, de gammaglobulines, la 1ère injection sera intra-péritonéale, les 3 suivantes intra-veineuses. Le même cycle sera recommencé chaque semaine. Les doses iront croissantes de la 1ère à la 15ème injection, selon la progression suivante : 1cc, 1cc, 1cc, puis 1cc, 5, puis 1,5 cc, puis 2 cc, 2cc, 2cc et 2 cc ; puis 3 cc, 3 cc, 3 cc et 3cc ; puis 5 cc et 5 cc.

Après 8 jours de repos, 2 injections de rappel sont faites à 5 jours d'intervalle, de 2 cc chacune.

Chacun des animaux immunisés sera saigné par ponction de la veine marginale de l'oreille, et la richesse du sérum en Anticorps sera appréciée soit par la méthode du ring-test, soit par la micro-méthode d'Ouchterlony ; les sérums de bonne qualité donnent un trait de précipitation net après dilution au 1/32°, en présence d'une solution de globulines titrant 1mg/cm³, disposée dans un godet distant du godet du sérum d'environ 8 mm. On réunit en un pool commun les sérums de bonne qualité.

c) Isolement de la fraction immunoglobulinique de l'immunsérum

Elle sera séparée par action d'une solution sursaturée de sulfate d'ammonium $\text{SO}_4 (\text{NaH}_4)_2$: 200 g dans 250 cc d'eau distillée. On traite 2 volumes de sérum par un volume de sulfate d'ammonium. On laisse reposer 1 heure à + 4°C, puis centrifugation à 0°C, 3.000 tours / minutes

Le culot de centrifugation est redissous dans de l'eau distillée et ramené au volume initial de sérum utilisé. L'opération se répète 5 fois, puis le dernier culot de centrifugation est repris avec du sérum physiologique, en quantité moitié moindre que le volume de sérum initial.

La séparation se termine par une dialyse, d'abord pendant 12 heures à 0° contre $\text{SO}_4 \text{Na}_2$ à 5 u, puis contre du sérum physiologique pendant 48 heures à 0°.

La concentration en protéines de la solution sera dosée par le biuret et ajustée à 13 mg par cm³.

2) Conjugaison de la solution d'immunoglobulines avec le fluorochrome

Le fluorochrome ou isothiocyanate de fluorescéine (Prolabo) est utilisé à une dose de 0,8 mg par 13 mg de protéines.

La quantité d'isothiocyanate nécessaire, pesée dans un micro-bécher est dissoute dans de l'acétone pure anhydre.

On dilue la solution des gammaglobulines de 2 fois son volume dans une solution de tampon - acétate à pH = 9,4, (Na_2CO_3 : 0,6 g ; NaHCO_3 : 3,7 g - eau bidistillée, O.S.P. 100 cc)

I- CONJUGUAISON .- La solution diluée de protéines est placée dans un Becher profond plongé dans un bain de glace, une agitation mécanique continue et douce étant assurée par agitateur mécanique, puis on verse la solution acétonique d'isothiocyanate goutte à goutte dans la solution protéique.

Au bout d'une 1/2 heure, on met le Becher contenant la solution en conjugaison avec son agitateur mécanique en chambre froide à +4°C,

et cela durant 24 heures.

II- PURIFICATION .- Compte tenu du matériel antigénique ici utilisé, l'élimination du fluorochrome non conjugué peut être faite de manière simple et rapide par addition de charbon végétal, à raison de 2,5 mg de charbon par mg de protéine versés dans le Becher. Après agitation durant 1 heure au bain de glace, le charbon actif s'élimine par centrifugation en centrifugeuse réfrigérée à grande vitesse.

III- CONSERVATION .- La purification permet d'obtenir un liquide clair et la solution obtenue se répartit en fractions de 1 cm³ dans les tubes à hémolyse bouchés au caoutchouc, qui sont conservés à - 20°C. On ne sort de la chambre froide que le nombre de tubes nécessaires au travail de la demi-journée.

Dans cette immunofluorescence portant sur des frottis bactériens presque purs, une purification de la fraction marquée par le fluorochrome sur des poudres de tissus animaux n'est pas nécessaire, car aucune fluorescence tissulaire non - spécifique n'est gênante.

TECHNIQUE DE LA REACTION

=====

a) PRÉPARATION DES FROTTIS

On dispose dans un bac plat horizontal un grand chevalet à coloration et sur celui-ci 9 frottis sur lames de bacilles de Stefanski. Ces lames doivent être dégraissées au préalable puis bien rincées, ensuite trempées une nuit durant, dans une solution contenant de l'acide chlorhydrique (Alcool à 90° + quelques gouttes d'acide chlorhydrique) ensuite elles sont égouttées, essuyées et conservées à l'abri de la poussière.

Pour chaque malade, les 9 lames seront recouvertes des dilutions

successives du sérum à étudier, dilutions à :

1/8e ; 1/16e ; 1/32e ; 1/64e ; 1/128e ; 1/256e
1/512e ; et 1/1024e

La 9ème lame sert de témoin pour épister une déconjugaison de l'immunsérum et sera donc recouverte d'un sérum de témoin sain dilué au 1/8e.

Le contact est maintenu 20'.

b) REACTION

Laver abondamment les lames à l'eau physiologique tamponnée à pH 7,2 pendant 10 ' et sécher au buvard.

- Recouvrir toutes les lames avec la solution d'immunoglobulines marquées diluées de son volume de sérum physiologique et laisser en contact 30'.

- Lavage abondant de chaque lame avec la solution tampon 3 fois 5'

- La lecture se fait à sec.

c) LECTURE DES RESULTATS.

Cette lecture sera faite en microscopie de fluorescence de préférence dans une chambre obscure, compte tenu de la faible luminosité des préparations.

On utilise comme source d'ultraviolets un brûleur à vapeurs de mercure OSRAM HBO 200. Le rayonnement est filtré par des filtres d'excitation UG₅ et UG₁ le condensateur à fond noir éliminant la nécessité d'emploi de filtres d'arrêt ; on évitera l'usage d'un objectif apochromatique parfois autofluorescent ; la lumière est renvoyée par un miroir métallique aluminisé.

Les bacilles marqués par fixation successive d'anticorps hanséniens, puis d'anticorps antiglobuline humaine rendus fluorescents, brillant sur fond noir par leur teinte jaune vert à différencier de l'autofluorescence blanc bleuâtre que peuvent donner quelques débris de fibres conjonctives et des ombres foncées qui peuvent apporter quelques débris de cellules ou de graisses. Des lames témoin permettent de détecter éventuellement une déconjugaison de l'immunoglobuline marquée, et une fixation non spécifique du fluorochrome mal conjugué.

La série des lames sera lue à partir de la dilution la plus forte du sérum étudié pour noter la dilution maximum pour laquelle apparaissent les bacilles fluorescents : le taux d'anticorps présents dans le sérum sera d'autant plus élevé que l'apparition de la fluorescence aura lieu pour une plus forte dilution.

Malgré quelques difficultés rencontrées au cours des lectures, l'observation rigoureuse de la technique a conduit, avec une lampe donnant un éclairage ultra-violet intense, à une standardisation satisfaisante des résultats.

RESULTATS

La possibilité de fausses négativités par phénomène de zone pour des sérums trop riches en anticorps, et à l'inverse de fausses positivités par intervention de facteurs non - spécifiques dans des sérums insuffisamment dilués, la possibilité de faibles réactions croisées avec l'infection tuberculeuse (où toutefois les anticorps sériques n'abondent que dans les formes cavitaires très évolutives), ont amené à ne pratiquer la recherche des anticorps hanséniens qu'avec des sérums dilués à 1/8e et au delà.

De très fortes positivités ont été constamment trouvées dans

les lèpres non antérieurement traitées, atteignant et même dépassant 1/1024e dans les formes lépromateuses, 1/512e dans les formes tuberculoïdes, 1/1024e ou 1/512e dans les formes borderline, 1/128e et plus dans les formes différenciées pour peu qu'elles soient naciennes.

Ainsi sur plus de 700 cas examinés tant de hanséniens confirmés que de cas découverts récemment et considérés à tort ou à raison comme suspects, le diagnostic par immunofluorescence sur bacille de Stefansky semble de valeur certaine dans le diagnostic de la lèpre, et surtout dans le diagnostic de la lèpre non traitée : le taux des anticorps sériques ainsi apprécié décroît en effet en général régulièrement sous l'influence d'un traitement anti-hansénien actif, à mesure que progresse l'amélioration clinique et biologique ; il tombe habituellement à 1/256e et 1/128e chez les lépromateux négativés depuis 6 mois à 1 an et chez les tuberculoïdes récemment blanchis .

Une positivité - limite pour une dilution de 1/128e peut être retenue comme de valeur diagnostique certaine ; mais si pour une dilution à 1/8e et même à 1/16e la possibilité d'un diagnostic de lèpre paraît initialement à éliminer, ce chiffre peut cependant correspondre à une forme anciennement et activement traitée.

Une positivité - limite à 1/32e et même 1/64e mérite d'être discutée elle peut correspondre à une forme débutante, sans pour autant permettre de l'affirmer en l'absence de tout signe cutané, nerveux ou autre. Mais elle peut sans doute aussi traduire une infection latente en milieu hansénien, allant de pair avec une positivité des lépromino-réactions (comme se positivent les tuberculino-réactions dans une infection latente par bacilles de Koch en milieu tuberculisé)

Dans les positivités - limites à très faibles dilutions il peut être très difficile d'affirmer que l'infection n'est pas due à quelque

autre mycobactérie d'antigénicité voisine.

L'évolution du taux des anticorps anti-hanséniens circulants appréciée par immunofluorescence sur bacilles de Stefansky, est intéressante à suivre au cours de lèpres traitées : sa brusque modification peut correspondre à une poussée réactionnelle débutante ou confirmée, et sa remontée à une reprise évolutive.

Malgré ses difficultés (et la fatigue rétinienne qu'entraîne sa lecture) le sérodiagnostic par immunofluorescence sur bacille de Stefansky mériterait de voir son emploi s'étendre au bilan initial systématique de la lèpre et s'ajouter aux examens pratiqués en cours de traitement.

SERO - DIAGNOSTIC DE LEPRE

SERUMS ETUDIES

25 Témoins normaux

651 Sérums pathologiques provenant de :

- 244 Hansen
- 100 lépromateux
- 144 tuberculofides
- 196 malades suspects de Hansen

TUBERCULOIDES

43 avant traitement	- { 1/512e ----- 1/256e -----	30 cas 13 cas
45 en cours de blanchiment	- 1/256e -----	45 cas
31 Blanchis depuis 1 an	- (1/128e ----- 1/64e -----	21 cas 10 cas
25 Blanchis depuis plus de 2 ans	< 1/32e -----	25 cas

SERUMS LEPROMATEUX

53 malades nouveaux non traités	1/1024e -----	53 cas
31 malades traités en cours de négativation	- (1/512e ----- 1/256e -----	20 cas 11 cas
8 malades négativés et blanchis	1/128e -----	8 cas
8 malades depuis plus de 1 an 8 malades totalement blanchis depuis plus de 2 ans	1/16e -----	8 cas

III - MISE EN EVIDENCE SUR L'INTESTIN ISOLE d'ANTICORPS DANS LE SERUM DE LEPREUX PAR UN ANTIGENE MURIN

Du fait de sa parenté antigénique, le bacille de Stefansky permet de confirmer l'existence d'anticorps sériques antihanséniens dans un sérum de lépreux ayant par contact préalablement sensibilisé passivement un fragment isolé d'iléon terminal de rat ou de cobaye.

Des recherches ont été initialement pratiquées expérimentalement avec des sérums de rats ayant développé un lépromes à la suite de l'inoculation de bacilles de Stefansky à la face interne de la cuisse. En étendre l'application aux sérums de malades atteints de lèpre y a confirmé l'existence d'anticorps capables de sensibiliser l'iléon de cobaye en en provoquant ensuite la contraction par l'antigène bactérien murin.

A - MATERIEL

1) L'appareillage se compose d'un bac à organe isolé et d'un système d'enregistrement sur cylindre à tambour de 30 cm réglé pour tourner sur la plus petite vitesse et recouvert d'une feuille de papier glacé noiricie de façon homogène. Les contractions d'un segment de la partie terminale de l'iléon sont enregistrées au myographe isotonique.

2) Le milieu de survie maintenu à 37° consiste en une solution de Tyrode c'est à dire 50 ml de Tyrode B, 100 ml de Tyrode A et eau distillée Q. S. P. 1000 ml, ajustée à pH 7, 8.

Tyrode A (CINA 80g
) ClK₂ 2 g
 (CaCl₂ anhydre 2g
) Mg Cl₂ 1 g
 (Na H₂PO₄ 0,5 g
) glucose 10 g
 Eau distillée q. s. p. 100 ml

Tyrode B CO₃ HNa 5g
 eau distillée 250 ml

3) L'iléon terminal est prélevé rapidement, avec lavage à la seringue 2 fois répété, après sacrifice et saignée de l'animal, rat ou cobaye, laissé à jeun depuis la veille. Un segment d'iléon d'environ 2 cm est fixé par une extrémité au crochet de distribution d'oxygène, l'autre extrémité étant relevé au levier inscripteur de l'appareil d'enregistrement, dans un récipient rempli de solution de Tyrode à pH ajusté à 7,8.

4) L'antigène provocateur fut initialement une suspension obtenue par broyat d'un fragment de lépromes développé chez le rat après inoculation de bacilles de Stefansky : le broyat obtenu dans le Tyrode avec un broyeur type Potter monté sur agitateur électrique, est centrifugé 30 secondes à 1.800 tours/ minute ; la suspension antigénique surnageante, opalescente doit être préparée extemporanément avant chaque expérience, le lépromes qui se développe chez le rat en 5 à 6 mois étant conservé à - 20° C.

Dans une série d'expériences ultérieures, l'antigène provocateur fut constitué par les bacilles de Stefansky eux-mêmes, extraits extemporanément du broyat de lépromes murin mis en suspension dans 10 cc de sérum physiologique et soumis à centrifugations successives ; une centrifugation à faible vitesse, à 3.000 t/m pendant 3 minutes, élimine les plus gros débris tissulaires ; le surnageant est centrifugé à grande vitesse, 12.000 t/m pendant 20 minutes, et le culot de centrifugation émulsionné dans 20 cc de solution physiologique soumis à une nouvelle centrifugation à grande vitesse pendant 20 minutes. Les bacilles sont ainsi traités à 4 reprises, une dernière centrifugation à faible vitesse (1.500 à 1.800 t/m) élimine les bacilles agglutinés et le surnageant final est une émulsion de bacilles restés vivants, car ils provoquent chez le rat en 4 mois un développement particulièrement rapide de lépromes avec envahissement bacillaire splénique et hépatique.

Qu'il s'agisse du broyat de léprome murin ou de bacilles de Stefansky purifiés, la suspension antigénique à utiliser est opalescente, doit avoir une densité optique de 130-120 avec filtre rouge 64 à l'appareil LABOSPAC Jobin et Yvon et une teneur minimum de 300 bacilles par champ en immersion au grossissement de 600 fois.

5) L'étalonnage des contractions d'iléon enregistrées est fait en équivalents histaminiques : l'iléon prélevé est fixé dans le récipient à organe, isolé et laissé au repos 10 minutes dans la solution de Tyrode puis 10 minutes dans une solution de glucose sensiblement isotonique à 5% ; après 3 lavages au sérum glucosé il est remplacé dans la solution de Tyrode et soumis à des doses croissantes d'histamine (0,1- 0,3- 0,75 mM par cc, ou 3×10^{-5} , 5×10^{-5} , 8×10^{-5} , 10×10^{-5} , 2×10^{-3} , jusqu'à 10×10^{-3}) chaque introduction de Tyrode chargé d'histamine étant séparée de la suivante par 3 lavages de 5 minutes de durée chacun. Une solution mère d'histamine renferme 1 mg de bichlorhydrate d'histamine pour 100 ml. La stabilité de l'intensité des contractions correspondant aux doses croissantes d'histamine peut être vérifiée en fin d'expérience.

B-ANAPHYLAXIE LOCALISEE IN VITRO DEMONTREE SUR L'ILEON DE RAT LEPROMATEUX

La sensibilisation active de l'iléon des rats ayant développé un léprome après inoculation de bacilles de Stefansky a été vérifiée préalablement dans 5 expériences par la réponse de contractions après addition d'antigène murin.

Après 3 lavages au sérum glucosé à 5 pour 100, l'iléon est mis à baigner dans du Tyrode convenablement oxygéné et l'émulsion antigénique est introduite à doses progressives, chaque introduction étant suivie de 3 lavages : les complexes antigène-anticorps formés entraînant une libération d'histamine, et la contraction produite peut être exprimée

en équivalent histaminiques.

C - ANAPHYLAXIE LOCALISEE IN VITRO APRES SENSIBILISATION PASSIVE D'ILEON

Douze iléons de rats et 3 iléons de cobayes, animaux non préalablement sensibilisés, ont été sensibilisés de façon passive par contact in vitro avec un sérum de rat ayant développé, après inoculation, un lépro-

me .
Le contact in vitro avec l'immunsérum pendant 30 ' avec le sérum glucosé à 50 % permet la fixation des Anticorps circulants qui sensibilisent ainsi de façon passive l'iléon. Plusieurs essais doivent être faits, car la dose d'antigène nécessaire peut varier de 0,5 à 5 cc de la solution opalescente dans 20 cc du milieu de survie.

L'iléon est ensuite soigneusement lavé à trois reprises au moins pour éliminer tout excès d'anticorps non fixé, puis remonté dans le récipient à organe isolé ; l'addition d'émulsion antigénique murine entraîne alors une contraction d'autant plus intense que le sérum étudié était plus riche en anticorps.

D. APPLICATION A LA MISE EN EVIDENCE D'ANTICORPS DANS LA LEPRE HUMAINE

La mise en évidence d'anticorps sériques dans le sérum des malades atteints de lèpre a utilisé l'étroite parenté antigénique entre bacille de Hansen et bacille de Stefansky. Les conditions techniques sont les mêmes, mais on a utilisé en général 3 ml de sérum pour 15 ml de glucosé à 5 %.

1) L'iléon mis à incuber avec un sérum humain normal ne se contracte pas par addition de la suspension antigénique de lépromes murins.

2) Les sérums de lépreux ont été étudiés au nombre de 46 : 12 provenant de formes tuberculoïdes, 34 de formes lépromateuses ; la suspension antigénique était réalisée dans les 23 premiers par une suspension de broyats de lépromes murins ; pour les 23 dernières expériences est utilisée une suspension purifiée de bacilles de Stefansky à des doses de 0,5 ml - 1 ml - 2 ml - 3 ml - 4 ml.

- Dans 45 cas on a obtenu une contraction de l'iléon de cobaye à l'introduction de l'antigène, avec un équivalent histaminique variant de 5×10^{-4} à 5×10^{-5} . Dans certains cas les réponses successivement obtenues avec des doses croissantes d'antigène entraînent un épuisement des possibilités de libération immunologique d'histamine par l'iléon et une diminution de la réponse avec la répétition d'une même dose de la suspension antigénique.

- Dans un cas, la réponse a été négative ; mais il s'agissait d'une femme ayant une forme lépromateuse traitée depuis de nombreuses années et à sérodiagnostic par immunofluorescence pratiquement négative.

Il est toutefois difficile de dire par cette technique s'il existe un taux d'anticorps sériques plus élevé dans la lèpre lépromateuse que dans la lèpre tuberculoïde.

Exemple d'une expérience

Iléon prélevé chez un cobaye de 220 g

Sérum provenant d'un patient atteint de lèpre lépromateuse découvert en janvier 1968, traité par 100 mg de Disulone et conservant un sérodiagnostic positif à 1/256e.

L'iléon est placé 10 minutes dans du liquide de Tyrode, puis 10 minutes dans du sérum glucosé à 5 %, puis 30 minutes dans 19,5 ml de sérum glucosé additionné de 0,5 cc de sérum de malade.

Après 3 lavages dans du sérum glucosé, puis du Tyrode, l'addition d'une émulsion de bacilles de Stefansky purifié et de densité optique 134 a été utilisée comme antigène aux doses successives de 0,5 cc, 1 cc, 2 cc, 3 cc, 4 cc.

Après lavage avec sérum glucosé, puis Tyrode, une contre-expériences a été pratiquée avec le même segment d'iléon avec un surnageant débarrassé de bacilles de Stefansky, puis a été établie une gamme d'histamine allant de 5×10^{-5} , $8 \times$, $10 \times$ puis 3×10^{-5} M par ml avec toujours chaque fois 3 lavages dans du sérum glucosé et Tyrode.

Les Résultats

TABLEAU II

cas	Forme clinique	Intestin isolé de cobaye antigène	Résultat	Equivalent histami- nique par cc
1	LA	suspension de broyat de léprose murin		10^{-4}
2	LA	"		10^{-4}
3	LA	"		$2 \cdot 10^{-4}$
4	LA	"		10^{-4}
5	LA	"		$3 \cdot 10^{-4}$
6	LA	"		10^{-4}
7	LA	"		°
8	LA	"		$2 \cdot 10^{-4}$
9	LA	"		$2 \cdot 10^{-4}$
10	LA	"		10^{-4}
11	LA	"		$3 \cdot 10^{-4}$
12	LA	"		$4 \cdot 10^{-4}$
13	LA	"		$2 \cdot 10^{-4}$
14	LS	"		10^{-4}
15	LS	"		10^{-4}
16	LS	"		10^{-4}
17	LS	"		$2 \cdot 10^{-4}$
18	LS	"		10^{-4}
19	T	"		10^{-4}
20	T	"		$2 \cdot 10^{-4}$
21	T	"		10^{-4}
22	T	"		10^{-4}
23	T	"		10^{-4}

- 23 -
TABLEAU III

1	LA	suspension purifiée de bacilles de Stefansky	$2 \cdot 10^{-4}$
2	LA	"	$3 \cdot 10^{-4}$
3	LA	"	$2 \cdot 10^{-4}$
4	LA	"	10^{-4}
5	LA	"	$4 \cdot 10^{-4}$
6	LA	"	10^{-4}
7	LA	"	$2 \cdot 10^{-4}$
8	LA	"	$3 \cdot 10^{-4}$
9	LA	"	$2 \cdot 10^{-4}$
10	LA	"	$2 \cdot 10^{-4}$
11	LA	"	$2 \cdot 10^{-4}$
12	LA	"	10^{-4}
13	LA	"	$5 \cdot 10^{-4}$
14	LS	"	10^{-4}
15	LS	"	10^{-4}
16	LS	"	10^{-4}
17	T	"	$2 \cdot 10^{-4}$
18	T	"	$2 \cdot 10^{-4}$
19	T	"	10^{-4}
20	T	"	10^{-4}
21	T	"	10^{-4}
22	T	"	10^{-4}
23	T	"	10^{-4}

CONCLUSION :

La présence d'anticorps dans les sérums de lépreux peut être démontrée par la contraction d'un sérum d'iléon terminal de cobaye, ayant fixé de façon passive les anticorps de ces sérums, cette contraction étant provoquée par addition d'une suspension antigénique préparée à partir de broyats de lèprome murin ou fait de bacille de Stefansky après purification.

A l'opposé, l'iléon mis à incuber dans un sérum humain normal ne se contracte par addition de la suspension antigénique.

IV- TRANSFORMATION BLASTIQUE DE LYMPHO- CYTES DE LEPREUX PROVOQUEE PAR ANTIGENE MURIN

Les bacilles de Stefansky présents dans les broyats de lépromes murins peuvent ainsi permettre de confirmer l'existence d'anticorps dans les sérums de lèpreux grâce à la parenté antigénique avec les bacilles de Hansen de la lèpre humaine, que ces anticorps se fixent sur les corps bacillaires et que cette fixation soit décelée par immunofluorescence ou qu'ils sensibilisent un segment d'iléon terminal de cobaye ou rendant possible sa contraction par addition d'un antigène murin.

Un broyat de léprome murin, les corps bacillaires extraits et purifiés par ultra-centrifugation peuvent confirmer leur valeur antigénique dans les recherches immunologiques sur la lèpre humaine en provoquant la transformation blastique des lymphocytes de lèpreux.

La découverte de NOWELL en 1960 a montré que le petit lymphocyte considéré jusqu'alors comme une cellule définitivement fixée, arrivée en fin de carrière et dépourvue du cytoplasme nécessaire aux processus de synthèse protéique, pouvait se transformer en lymphoblaste : sous l'effet de certaines stimulations, comme l'addition de phytohémagglutinine à une culture de lymphocytes, ceux-ci se multiplient par mitoses et se transforment en cellule à gros noyau muni de nucléoles, entouré d'un volumineux cytoplasme basophile, pyroninophile, riche en ribosomes et en vacuoles, rappelant le lymphocyte primitif.

A- LA TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE

1) Phénomène morphologique

- a) La transformation du petit lymphocyte est un phénomène s'accom-

pagnant de profondes modifications morphologiques. Au microscope optique, cette cellule blastique se présente comme une grande cellule de 20 à 30 de diamètre, au cytoplasme homogène, très basophile, pyroninophile contenant de nombreux organites et de multiples vacuoles claires et avec un noyau volumineux arrondi et nucléolé.

b) Les cellules blastiques sont, sur les frottis colorés au May Grünwald GIEMSA, souvent agglomérées en amas plus nombreux à la périphérie. Certaines sont en mitoses, surtout aux stades de prophase et de t éléphase. D'autres sont accolées autour d'une cellule phagocytaire et forment des images en rosette.

c) Une difficulté d'interprétation du frottis vient du fait que sur la lame on observe tous les intermédiaires entre le lymphocyte normal d'un diamètre moyen de 8 à 10 μ et le lymphoblaste classique. Ces cellules intermédiaires ont un diamètre de 12 à 20 μ , plus grandes que les lymphocytes, plus petites que les cellules de type blastique, bien qu'elle en évoquent déjà l'aspect.

La distinction n'est pas toujours aisée entre le lymphoblaste et la cellule macrophagique, cette dernière pouvant cependant être fréquemment reconnue par un matériel eosinophile provenant de débris des cellules ingérées.

d) La microscopie électronique a permis de préciser la structure du noyau du lymphoblaste, avec un ou plusieurs nucléoles et une chromatine fine ou condensée en mottes épaisses à la périphérie. Le cytoplasme est riche en particules ribosomiques; l'appareil de Golgi est habituellement bien développé, les mitochondries sont en nombre variable; plus particulière au lymphoblaste est l'existence de corps électroniquement opaques qui correspondent à des vésicules visibles en microscopie optique et qui semblent représenter des lysosomes.

2) Facteurs mitogénétiques

a) Ils sont nombreux et variés.

Divers stimuli physiques T.^s ultrasons, chimiques (en particulier 2 enzymes : la trypsine et la chimiotrypsine) , microbiens , (notamment les toxiques microbiennes) peuvent entraîner la transformation lymphoblastique de lymphocytes en culture.

b) Parmi les substances végétales, la phytohémagglutinine est la plus importante et la mieux étudiée. Cette substance active est extraite du haricot (*Phaseolus vulgaris*). Il s'agit de mucoprotéines constituées par plusieurs fractions (acides aminés, glucides, lipides, etc...)

Biologiquement la phytohémagglutinine comprend une hémagglutinine et une leucostimuline à laquelle est attribuée l'activité mitogénétique, bien qu'en réalité les 3 principes semblent participer à cette activité.

L'activité hémagglutinante a pu être dissociée de l'activité leucostimulante par adsorption sur stroma érythrocytaire.

Par contre les activités leucoagglutinantes et leucostimulantes n'ont pu être séparées, ce qui laisse à penser que ces deux activités sont étroitement liées.

Introduite in vivo, la phytohémagglutinine est antigénique

In vitro elle entraîne sans aucune sensibilisation préalable une transformation lymphoblastique qui débute à la 24^e heure et qui peut atteindre à la 72^e heure un taux de l'ordre de 70 %.

Fait du plus haut intérêt immunologique, la transformation statistique est déclenchée par les antigènes auxquels le malade, dont proviennent les lymphocytes, est sensibilisé. Cependant le taux des transfor-

mations est en règle moins important qu'avec la phytohémagglutinine et le maximum est atteint plus tardivement, au quatrième et au cinquième jour.

3- Mécanisme de la blastogénèse

Le stimulus semble agir directement sur la cellule et se passer de tout intermédiaire.

a) Le point de départ de la transformation serait la rupture de la membrane lysosomale avec libération d'enzymes contenus dans les lysosomes. Un certain nombre d'arguments plaide en faveur de cette hypothèse : cette libération d'enzymes lysosomaux a été observée après stimulation par la phytohémagglutinine ; on observe une inhibition de la transformation lymphoblastique avec la prednisone et la chloroquine qui stabilisent la membrane lysosomale.

b) La libération d'enzymes lysosomaux provoquerait la dissociation de l'AR N existant et fournirait des précurseurs pour un nouvel AR N de transfert et un nouvel AR N Messager, indispensables à la production de gammaglobulines par les lymphocytes.

4- Signification de la blastogénèse

a) La transformation lymphoblastique est un phénomène de nature non immunologique, quand à l'origine de cette transformation sont des stimuli physiques ou chimiques, des agents microbiens ou des substances végétales, avec pour chef de file la phytohémagglutinine.

La mécanisme de déclenchement de cette transformation est par contre de nature immunologique quand la transformation est

induite par un antigène auquel le malade qui a fourni les lymphocytes est sensibilisé.

Les arguments en faveur de la nature immunologique sont en effet nombreux :

- immunocompétence du lymphocyte
- secrétion d'anticorps par les lymphoblastes
- inhibition de la transformation blastique par la prednisone.

b) La transformation lymphoblastique répond à 2 types d'immunité

- l'immunité tissulaire ou état de réactivité immunologique de type hypersensibilité retardée
- l'immunité de greffe à laquelle correspond la transformation blastique en cas de culture de lymphocytes hétérologues.

La transformation du petit lymphocyte en lymphoblaste phénomène biologique d'une grande complexité, a trouvé de nombreuses applications pratiques.

Aussi il a semblé intéressant d'étudier la transformation lymphoblastique possible des formes tant tuberculoïdes que lépromateuses de lèpre humaine sous l'effet de la phytohémagglutinine et sous l'effet de l'action antigénique d'un broyat de léprome murin d'abord, et d'une suspension purifiée de bacilles de Stefansky ensuite.

B - TECHNIQUE

Les manipulations doivent toujours être faites de façon parfaitement stérile.

1) Préparation des lymphocytes en culture

Prélever le sang du malade à jeun, comme pour une hémoculture par exemple avec une tubulure en plastique reliée à chaque extrémité à une aiguille, l'une introduite dans la veine, l'autre traversant une capsule de papier argenté placée avant stérilisation sur le goulet d'un flacon de verre. Ajouter aux 20 à 30ml de sang recueilli 1 ml de calciparine. Maintenir à + 37°C.

Les flacons de sang sont agités soigneusement pour obtenir la meilleure homogénéisation, puis placés à l'étuve à 37°C et inclinés à 45°.

Le temps de sédimentation varie de 30' à 60' pour les globules rouges. le plasma obtenu doit être jaune et riche en globules blancs ; on pipette doucement le surnageant jusqu'à 1cm et même 0,5 cm des globules rouges.

Pour séparer les cellules mononucléaires des polynucléaires, le surnageant est filtré sur laine de verre à laquelle ces derniers vont adhérer. La colonne de filtration est constituée par un tube d'Allihn de porosité n° 2 dans lequel on tasse 2 à 3 grammes de laine de verre soigneusement lavée et séchée pendant 24 heures.

La suspension filtrée contient de 70 à 80 % de cellules mononuclées (essentiellement des lymphocytes) le reste des éléments en suspension est constitué d'hématies (5 à 10 %) et les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles qui disparaissent rapidement de la culture réalisée avec 30 % de cette suspension et 70 % de milieu 199 de Parker. On obtient alors approximativement une concentration de 1.000.000 de cellules mononuclées par ml, on répartit ensuite le plasma autologue avec le milieu 199 de Parker en fractions de 3 à 5 ml dans des tubes à essai numérotés et contenant :

1er tube : seulement le mélange milieu synthétique + plasma

2ème tube : phytohémagglutinine (P.H.A.) II gouttes de solution
(= 1/10e de ml)

2) Préparation de la phytohémagglutinine (P.H.A.)

Dans un flacon contenant la PHYTO- PHA Egic en poudre on ajoute 5 ml de milieu synthétique qui la dissoud. On met ensuite III gouttes de cette solution dans le 2ème tube.

3) Mise à l'étuve à 37° C de tous les tubes pour une durée de :

- Pour P.H.A = 3 jours

- Pour les antigènes de 5 à 7 jours.

4) On retire ensuite le surnageant. On pipette le culot cellulaire pour obtenir une suspension homogène, puis on étale sur lame d'histologie, on sèche puis colore par May Grunwald Giemsa.

Dans chaque expérience on pratique , à côté de la culture soumise à provocation antigénique, une culture témoin des lymphocytes du malade sans addition d'antigène et une culture en présence de phytohémagglutinine avec III gouttes de la solution obtenue en ajoutant 5 cc de milieu 199 de Parker à un flacon de phytohémagglutinine lyophilisée (P.H.A Egic).

5) L'antigène utilisé provient d'un broyat de léprome fragmenté développé chez le rat après inoculation de bacilles de Stefansky.

Après broyage dans l'eau distillée avec un broyeur type Potter et centrifugation 30 sec. à 1800 tours /m on recueille le surnageant opalescent dont la densité optique doit être voisine de 300 avec le filtre n° 64 de l'appareil de LABOSPAC JOBIN ET YVON et dont la teneur en bacilles

de Stefansky doit être en moyenne de 300 bacilles par champ avec un grossissement de x .600

L'antigène provocateur peut également être constitué par les bacilles extraits extemporanément d'un fragment de lépromes développé chez le rat après inoculation de bacilles de Stefansky et conservé à -20°C.

Ce fragment après broyage est mis en suspension dans 10 cc de sérum physiologique ; une centrifugation à faible vitesse à 3.000 t/m pendant 3 minutes élimine les gros débris tissulaires, et le surnageant est alors centrifugé à grande vitesse, 12000 tours/m pendant 20 minutes. Les bacilles sont ainsi traités à 4 reprises. le culot final est émulsionné dans du sérum physiologique de façon à obtenir une suspension opalescente analogue par ses caractères physiques à la suspension précédente c'est à dire ayant une densité optique voisine de 130 à l'appareil LABOSPAC JOBIN ET YVON, filtre rouge 64, et une teneur maximum de 300 bacilles par champ en immersion avec grossissement 600. Une dernière centrifugation de 3 minutes à faible vitesse (15 à 1800 tours/m) élimine les bacilles agglutinés.

C'est avec III gouttes de la solution opalescente d'antigène que la réponse obtenue est optima car si des doses plus élevées (VI à XII gouttes) peuvent donner un taux de transformation blastique plus élevé, la lyse secondaire est due à un effet toxique de l'antigène

La durée optima d'incubation est de 96 heures

C - LA LECTURE DU TEST de TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE

Elle se fait avec un objectif à immersion avec une goutte d'huile de cèdre sur la coupe. Les lymphoblastes se trouvent surtout à la périphérie.

Le compte de la transformation blastique est fait sur 500 cellules, le pourcentage des lymphoblastes transformés par rapport aux lymphocytes étant établi en ne comptant que ces 2 types de cellules à l'exclusion de tout autre ; les cellules intermédiaires peuvent être comptées avec les lymphocytes non transformés.

Le lymphocyte normal a un diamètre moyen de 8 à 10 ; le lymphoblaste de 20 à 30 avec la morphologie caractéristique déjà indiquée.

Le test a été considéré comme positif quand les cultures contiennent en présence de l'antigène plus de 4% de cellules blastiques avec moins de 2 % dans les cultures témoins, c'est à dire en l'absence de l'antigène.

D- LES RESULTATS DANS LA LEPRE

L'étude a porté sur des lymphocytes provenant de 49 sujets lépreux : 16 tuberculofides et 33 lépromateux (25 en activité et 8 stabilisés) Dans les tableaux IV et V sont successivement indiqués les cas soumis à la provocation antigénique par le broyat de lèprome murin et par l'émulsion de bacilles de Stefansky.

1) Les lymphocytes de 13 des 16 lèpres tuberculofides n'ont subi de transformation blastique ni avec l'antigène murin, ni même pratiquement avec la phytohémagglutinine (qui provoque normalement des transformations de l'ordre de 60 %).

2) Les deux cas où l'antigène murin a donné un taux de transformation de 25 et de 12 % alors que la phytohémagglutinine ne donnait respectivement que 8,5 et 6 %, correspondaient à des tuberculofides majeurs.

TABLEAU IV

Transformation Lymphoblastique dans des lèpres tuberculoides

CAS	Forme clinique	Antigène Murin	Phytohémagglutinine
A - Provocation par broyat de Lépromes murin			
1	T	50	56
2	T M	25	8, 5
3	T	3	6
4	T	3	3
5	T	2	4
6	T	1	4, 5
7	T	1	2
8	T	0, 5	1
9	T	0, 2	1
10	T	0, 2	0, 2
B - Provocation par bacilles de Stefansky			
1	T	3	1
2	T	0	0
3	T M	12	6
4	T	1	5
5	T	0, 5	3
6	T	2	4

Les lymphocytes provenant des 8 formes lépromateuses stabilisées résistèrent eux aussi dans l'ensemble à la provocation aussi bien des antigènes murins que de la phytohémagglutinine.

3) Avec un antigène murin, une transformation significative de 6 % ne fut observée que dans un cas alors que la transformation restait non significative à 3 % dans le seul cas où la phytohémagglutinine donnait une transformation normale à 58 %.

Par contre, les lymphocytes provenant des formes lépromateuses ont subi des transformations lymphoblastiques significatives avec le broyat de léprome dans 8 cas sur 19 avec les bacilles de Stefansky, dans les 11 cas étudiés avec, ici, des taux de transformation très élevée et dépassant toujours 20 % et même 50 % dans 6 cas sur 11. Il est vrai que si les lymphocytes des formes lépromateuses ont dans l'ensemble répondu à la stimulation non spécifique de la P. H.A., il s'est trouvé que, dans 10 de ce dernier groupe de 11 cas, ils réagissent de façon particulièrement satisfaisante.

Il faut, bien entendu, s'assurer avant d'étudier la transformation lymphoblastique possible, de la muqueuse de chloroquine (Nivaquine) ou de tout autre médicament qui inhiberait toute possibilité de transformation blastique (voir tableau VI)
(14 cas = 5 tuberculoïdes et 9 lépromateux chez lesquels le test de transformation était négatif aussi bien après stimulation non spécifique par l'antigène représenté par les corps bacillaires que par la PHA)

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que la chloroquine comme la prednisone stabilise la membrane lysosomiale dont la rupture entraînerait la libération d'enzymes contenus dans les lysosomes, ce qui serait le point de départ de la transformation blastique.

ACTION DE LA CHLOROQUINE(14 cas)

CAS	Phytohémagglutinine	Antigène murin	Forme clinique	Séro-diagnostic
1	2	1	T	1/128
2	1	1, 5	T	1/64
3	1	0, 5	T	1/16
4	6	0, 5	T	1/256
5	6	1, 5	T	1/128
6	0, 5	0, 2	LS	1/256
7	2	0, 5	LS	1/512
8	3	1	LS	1/512、
9	3	0, 5	LS	1/256
10	2	1, 5	LA	1/512
11	12	0, 5	LA	1/512
12	2	1	LA	1/512
13	7	0, 5	LA	1/512
14	0, 5	0, 2	LA	1/512

5) Il est à rappeler toutefois que la sensibilité à la stimulation par la P.H.A. des lymphocytes des Hanséniens en culture a été également trouvée déprimée par DIERKS R.E. et SHEPARD C.C., mais à l'opposé des résultats ci-dessous mentionnés, cette dépression leur avait paru plus marquée dans les formes lépromateuses actives que dans les formes lépromateuses non actives traitées depuis longtemps et que dans les formes tuberculoïdes.

Par contre SHEAGREN J.M. , BLOCK J.B. , TRAUTMAN J.R. et WOLF S.M. auraient trouvé des taux normaux de transformation lymphoblastique avec la phytohémagglutinine (avec cependant une dépression nette de cette transformation avec la streptolysine 0).

*x

* *

Dans la lèpre tuberculoïde l'intradermo-réaction à la lépromine extraite de lèpromes riches en bacilles de Hansen, donne à côté de la réaction tardive de Mitsuda qui reproduit le type lésionnel de cette forme de lèpre, la réaction allergique différée de Fernandez qui semble correspondre à une hypersensitivité retardée où normalement le T.T.L. doit être positif.

A l'opposé, la négativité des lépromino-réactions dans la lèpre lépromateuse fait parler de moindre résistance et d'anergie et cependant c'est ici que le T.T.L. a été dans l'ensemble positif avec la mise en évidence par immunofluorescence de taux d'anticorps sériques plus élevés dans les lèpres lépromateuses que dans la lèpre tuberculoïde.

Est à expliquer, l'absence habituelle de transformation lymphoblastique aussi bien sous la provocation antigénique des bacilles de Stefansky que sous la stimulation non spécifique de la P.H.A. pour les lymphocytes provenant de lèpres humaines tuberculoïdes ou lépromateuses stabilisées.

TABLEAU V

Transformation lymphoblastique dans des lèpres lépromateuses

L.A.: Lèpres actives - L.S. : Lèpres stabilisées ou en cours de stabilisation

CAS	Forme clinique	Antigène murin	Phytohémagglutinine
A- Provocation par broyat de léprome murin			
1	L.A.	22	30
2	L.A.	12	25
3	L.A.	10	72
4	L.A.	8	4
5	L.A.	7	70
6	L.A.	6, 5	6
7	L.A.	6	45
8	L.A.	5	50
9	L.A.	3	12
10	L.A.	3	6
11	L.A.	3	2, 8
12	L.A.	2	1, 5
13	L.A.	1	2
14	L.A.	0, 2	0, 2
15	L.S.	6	28
16	L.S.	3	58
17	L.S.	3	4
18	L.S.	1, 5	2
19	L.S.	1	2
B- Provocation par bacilles de Stefansky			
1	L.A.	85	80
2	L.A.	78	57
3	L.A.	75	70
4	L.A.	70	49
5	L.A.	70	40
6	L.A.	69	65
7	L.A.	54	60
8	L.A.	26	12
9	L.A.	20	20
10	L.A.	27	35
11	L.A.	30	75
12	L.S.	4	1
13	L.S.	2	6
14	L.S.	4	5

Conclusion dans cette série, sous l'effet de stimulus antigénique des corps bacillaires lépromateux murins, comme sous l'effet de stimulus non - spécifique de la P.H.A., a été habituelle l'absence de transformation blastique des lymphocytes provenant de lèpres tuberculofides et de lèpres lépromateuses en voie de stabilisation, et par contre, l'habituelle positivité de cette transformation dans les formes lépromateuses en activité.

Ces résultats qui se rapprochent de ceux antérieurement obtenus avec un broyat de léprome murin, confirment la valeur antigénique des corps bacillaires de Stefansky et justifient les recherches actuellement entreprises au Laboratoire de Recherches Léprologiques du Professeur F-P. MERKLEN sur les diverses fractions antigéniques détenues par ultracentrifugation en gradients de densité à partir de ces corps bacillaires lysés

Reste à expliquer l'absence habituelle de transformation lymphoblastique aussi bien sous la provocation antigénique des Bacilles de Stefansky que sous la stimulation non - spécifique de la P.H.A. pour les lymphocytes provenant de lèpres humaines tuberculofides ou lépromateuses stabilisées.

V- UTILISATION D'AUTRES PARENTES
ANTIGENIQUES ET AUTRES RECHERCHES
IMMUNOLOGIQUES

Du point de vue de la recherche expérimentale dans l'immunologie de la lèpre sont également à signaler les deux constatations suivantes :

1°) le B.C.G. est capable de provoquer un virage de la lépromino-réaction chez l'homme comme chez l'animal, ce qui cadre avec la parenté antigénique entre bacille de Koch, Bacille Calmette Guérin et bacille de Hansen. A partir de ce fait, le B.C.G. est utilisé dans la prophylaxie de la lèpre, avec l'idée que la résistance à l'infection hansénienne était aussi augmentée parallèlement à la résistance à la tuberculose.

Au contraire de ce qui se passe dans l'espèce humaine, dont les individus possèdent des histiocytes de type E ou L, ou les deux chez les mêmes sujets - rarement il est vrai - , un rat ne peut avoir qu'un seul histiocyte de type L. Chez les rats non préparés auparavant avec le B.C.G. et récemment ^{avec} une inoculation de bacilles murins, la réaction histologique est différente de celle des animaux de contrôle ; ils présentent la formation de microabcès, ou l'apparition précoce de nécrose, qui ne se manifestent pas chez les témoins vaccinés au B.C.G.

Les observations de HANKS, AZULAY et TANIMURA montrent que les rats préparés par le B.C.G. et recevant une injection de bacille murin ont une réaction plus bénigne par rapport aux témoins. Le fait de cette résistance peut sans doute s'expliquer par la qualité des histiocytes, mais aussi par la parenté antigénique entre B.C.G. et bacille de Stefansky.

En ce qui concerne les cobayes, les mêmes résultats sont observés, à savoir le virage des réactions à la lépromine chez des sujets ayant reçu le B.C.G., virage atteignant un maximum pour une certaine dose bien déterminée. De plus la vaccination préalable par le B.C.G. accélère le processus évolutif de l'infection expérimentale par le bacille murin chez le Hamster ; ce qui peut paradoxalement s'expliquer par la dose de vaccin injecté.

2°) Enfin sont à noter les tentatives d'exploration immuno-allergologique chez des lépreux, lépreux quiescents ou réactionnels et dans les lèpres de type lépromateux. Ainsi furent pratiqués :

a) Les tests de transformation lymphoblastique des leucocytes en culture en présence de Phytohéماغglutinine, de Lépromine et de Disulone

b) Des tests de dégranulation des basophiles du lapin ou test de Shelley en présence de Lépromine et de Disulone. Ce test serait positif lorsqu'il est le témoin d'un complexe antigène- anticorps et permettrait de déceler les anticorps circulants sériques

c) Des tests au latex-histamine pour la recherche d'une défaillance du pouvoir anti-histaminique du sérum (MIKOL, MERKLEN, et RENOUX). L'histamine étant libérée lors des conflits antigène- anticorps: ce pouvoir est différent chez le sujet normal où il est puissant et chez le sujet allergique où il est faible.

Dans la technique utilisée , c'est à l'aide d'une réaction d'agglutination d'un support inerte ayant fixé l'histamine que l'on recherche le facteur anti-histaminique du sérum : l'antigène est représenté par des particules de latex sur lesquelles l'histamine est fixée.

Sont considérés comme normaux les sérums agglutinants faits d'une dilution au 1/160e et comme pathologiques, dans le sens allergique, ceux qui agglutinent à des dilutions inférieures au 1/40e

Les résultats de témoins ont été obtenus sur 4 malades.

TABLEAU VI

Exploration immuno-allergologique de Lépreux Lépromateux(LL)
ou Borderline (LB)

	Type de L	T T L	Shelley	Mikol, Merklen, Renoux
	LL LB quiescents réactionnels	- : de 0,5 à 1% + 6 ou 7 % ++ ou (+++) à + 50 %	(+) ou (-)	Aggl. Nx : 1/160 (+) - 1/40e
1	LLQ	Disulone (-) Lépromine(+)	non pratiqué	non pratiqué
2	LLQ	Disulone(-) Lépromine(+)	Lépromine(-) Disulone (-)	Agglutination 1/160
3	LLR	Disulone (-) Lépromine(+)	Lépromine(-) Disulone (-)	Agglutination 1/10e +
4	LB R	Disulone (-) Lépromine(+)	Lépromine(-) Disulone ±	Agglutination 1/20e +

Il semble donc que par le T T L et le Test de Shelley, il est difficile de différencier et d'affirmer dans les flambées réactionnelles le rôle du bacille (Lépromine) ou du médicament - Disulone) à l'origine des réactions lépreuses. Par contre, le test d'agglutination histaminique recherchant le pouvoir anti-histaminique des sérums serait ici apparu anormal chez les malades atteints de lèpre

réactionnelle ce qui tendrait à montrer le rôle qu'y pourrait jouer un terrain allergique, soit primitif, soit secondaire à la maladie de Hansen.

Il est d'ailleurs possible de penser que les réactions lépreuses peuvent être dues à l'interaction de plusieurs facteurs : terrain allergique + antigénicité microbienne + facteur déclenchant (médicament ou quelque'autre intervention pathogène extérieure ou interne).

B I B L I O G R A P H I E

CARPENTER

Murine Leprosy. Son utilité comme infection expérimentale
ANN. NEW YORK AC. SCIENCES , 54 , 10- 11, 1951

CHAUSSINAND

L'infection murine due au bacille de Stefansky n'est pas une lèpre
BULL. DE L'ACADEMIE NATIONALE DE MEDECINE , 132, 486, 1948

Pr HAUDUROY, Dr EHRINGER et Coll.

Dictionnaire des Bactéries Pathogènes , 1953

A. GARD

Application de l'immunofluorescence sur bacille de Stefansky au
diagnostic sérologique de la lèpre humaine
Thèse Médecine Paris 1966

INTERNATIONAL JOURNAL OF LEPROSY

Juillet septembre 1964, 32, 310 321

LOWE

Tuberculosis and Leprosy : Immunologic studies
LEPROSY REV. avril 1953

MERKLEN F-P et COTTENOT F

Sérodiagnostic par immunofluorescence sur bacille de Stefansky
chez les lèpreux

COLLOQUE INTERNATIONAL SUR LA LEPRE (HAMMAMET)
23 - 25 octobre 1967 et BULLETIN de l'ASSOCIATION DES
LEPROLOGUES DE LANGUE FRANCAISE , 1 , 8 5 août 1968

MERKLEN F-P. , COTTENOT F. et GALISTIN P.

Anticorps mis en évidence par immunofluorescence dans les
sérum de lèpreux humains

C.R. ACADEMIE DES SCIENCES , 257, 2212, 1963

MERKLEN F-P. et POTIER J.C.

Provocation par bacilles extraits de lépromes murins de la
contraction d'un segment d'iléon de cobaye sensibilisé
par un sérum de lèpre humaine

SOCIETE DE PATHOLOGIE EXOTIQUE. , 8 juillet 1970

MORRIS, AULISIO, BOZEMAN et GUINTO

Fluorescent antibodies study of human leprosy bacillus
BACTERIOLOGICAL PROCEEDINGS 123 (1961)

NOWELL P.C.

Phytohemagglutination an initiator of mitosis in culture of
normal human leucocytes

CANCER RESEARCH 20, (1960)

POTIER J.C.

Détection d'un anticorps sur l'intestin isolé de cobaye, de l'anticorps dans le
sérum de lépreux

SOCIETE DE BIOLOGIE 9 décembre 1969 t 163 n° 12 p 2542

J. C. POTIER présenté par F.P. MERKLEN

Transformation lymphoblastique des lymphocytes de lépreux
provoquée par broyats de lépromes murins

BULL. SOC. de PATHOLOGIE EXOTIQUE 62, 987- 992, 10 décembre 1969

REVISTA BRASILEIRA DE LEPROLOGIA 93, 164 déc. 1961

TEMINE P. LATOURELLE P. BACHELLERIE D.

Explorations immuno-allergologiques chez les lépreux LL ou
LB quiescents et réactionnels à l'aide de test de transformation
lymphoblastique du test de Shelley et du test au latex histamine
de Mikol

Acta Leprologica 40 - 41, 27, 1970

CONCLUSIONS

L'existence d'anticorps sériques au cours de la maladie de Hansen humaine a pu être mise en évidence par immunofluorescence indirecte après leur fixation tant sur le bacille de Stefanski de la lèpre murine que sur le bacille de Hansen humain.

Cette parenté antigénique a permis l'appréciation par dilution - limite du taux des anticorps sériques et la mise au point d'une méthode de séro-diagnostic apparemment valable sur le bacille de Stefanski. Le taux des anticorps sériques baisse sous l'influence du traitement.

L'emploi d'un broyat de lépromes murins, ou mieux de bacilles de Stefanski extraits par ultracentrifugation de ces lépromes, sur l'iléon de cobaye sensibilisé par contact avec ces sérums a confirmé l'existence d'anticorps dans le sérum des lépreux.

Des broyats de lépromes murins, ou les bacilles de Stefanski extraits par ultracentrifugation de ces lépromes, peuvent provoquer la transformation lymphoblastique des lymphocytes de lépreux quand les lymphocytes proviennent de formes lépromateuses actives ; si les lymphocytes des lèpres tuberculoides et des formes lépromateuses blanchies semblent insensibles à ce stimulus spécifique, ils le sont aussi au stimulus non-spécifique de la phytohémagglutinine.

Ainsi a pu être utilisé de façon valable comme antigène dans des études immunologiques sur la lèpre humaine des broyats de lépromes murins ou mieux les bacilles de Stefanski que l'on peut en extraire.

VU le Président de Thèse
Professeur F-P. MERKLEN

VU LE DOYEN de la
Faculté Broussais - Hotel Dieu
Professeur P. MILLIEZ

VU le Recteur de l'Académie de
PARIS
R. MALLET

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION. GENERALITES	
I.-MISE EN EVIDENCE PAR IMMUNOFLUORESCENCE d'ANTICORPS SERIQUES DANS LA LEPRE HUMAINE	
A.- IMMUNOFLUORESCENCE SUR BACILLE DE HANSEN.....	5
B. IMMUNOFLUORESCENCE SUR BACILLE DE STEFANSKY.....	7
II.- APPLICATION DIAGNOSTIQUE: SERODIA- GNOSTIC PAR IMMUNOFLUORESCENCE SUR BACILLES DE STEFANSKY	8
TECHNIQUE	14
RESULTATS.....	
III.- MISE EN EVIDENCE SUR L'INTESTIN ISOLE D'ANTICORPS DANS LE SERUM DE LEPREUX PAR UN ANTIGENE MURIN	
A.- MATERIEL. I.....	17
B. ANAPHYLAXIE LOCALISEE IN VITRO DEMONTREE SUR L'ILEON DE RAT LEPROMATEUX.....	19
C.- ANAPHYLAXIE LOCALISEE IN VITRO APRES SENSIBILISATION PASSIVE & L'ILEON.....	20
D.- APPLICATION A LA MISE EN EVIDENCE D'ANTICORPS DANS LA LEPRE HUMAINE.....	20
IV.- TRANSPLANTATION DE LYMPHOCYTES DE LE- PREUX PROVOQUEE PAR ANTIGENE MURIN...	
A.- LA TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE.....	24
B.- TECHNIQUE.....	28
C.- LA LECTURE DU TEST DE TRANSFORMATION LYMPHO- BLASTIQUE.....	31
D.- LES RESULTATS DANS LA LEPRE.....	32
V.- UTILISATION D'AUTRES PARENTES ANTIGENIQUES et AUTRES RECHERCHES IMMUNOLOGIQUES.....	38
BIBLIOGRAPHIE	42
CONCLUSIONS.....	44

